

стороны сенсорного (?) звена сети. Напомним, что при повышении температуры оборонительная доминанта особи понижается. Отмеченная особенность не является жестко предопределенной, так как только одна клетка из пяти рядом расположенных исследованных нейронов F-группы реагировала на раздражение клетки C-кластера. Заметим, что наблюдаемое усиление спайковой активности ряда нейронов F-группы может свидетельствовать об их вовлеченности в реализацию поведенческих программ не оборонительного характера, но связанных с активными перемещениями раковины относительно тела животного, например дыхательной, локомоторной. Видимо, должны существовать и другие сенсорные входы на нейроны F-группы, активация которых позволяет животному должным образом реагировать на установление новых равновесий в окружающей среде.

Таким образом, в основе интеграции клеток в единую нейронную сеть у *Lymanaea* при действии повышенных (пониженных) температур лежит перестройка процессов межклеточной коммуникации.

1. Кэндел Э. Клеточные основы поведения. М., 1980.

2. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. М., 1982.

3. Сидоров А.В. // Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова. 2003. Т. 53. С. 521.

4. Sidorov A.V., Gourine V. N. // Весті НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. 2002. № 3.

С. 12.

5. Benjamin P.R., Winlow W. // Сотр. Biochem. Physiol. 1981. Vol. 70A. P. 293.

6. Зайцева О.В., Шувалова Н. Е. // Нейрофизиология. 1988. Т. 20. С. 785.

7. Elekes K., Kemenes G., Hiripi L. et al. // J. Сотр. Neurol. 1991. Vol. 307. P. 214.

8. Elekes K., Kemenes G., Hiripi L. // Symp. Biologica Hungarica. 1988. Vol. 36. P. 703.

9. Bright K., Kellet E., Saunders S. E. et al. // J. Neurosci. 1993. Vol. 13. P. 2719.

Поступила в редакцию 10.09.2004.

Александр Викторович Сидоров - кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных.

УДК 579.8.841.11:252.5

М.А. ТИТОК

СВОЙСТВО ТЕМПЕРАТУРНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ПЛАЗМИДЫ pMT2 (IncP-9)

We have isolated and characterized a temperature resistant variant of the pMT2 plasmid (IncP-9). The C→A transversion stabilizing the pMT2 plasmid is located within the region of the *rep* gene promoter. This point mutation leads to increased expression of the Rep protein which could be registered via activity of the *rep* gene promoter. We suggest, that temperature instability of the pMT2 plasmid is linked to replication initiation and depends on the cellular concentration of the Rep protein.

Плазмиды группы P-9 несовместимости характеризуются большим разнообразием фенотипических маркеров и представлены плазмидами антибиотикорезистентности и биodeградации, способными передаваться в клетки различных грамотрицательных бактерий [1, 2].

Отличительной особенностью плазмиды pM3 группы IncP-9 является неспособность поддерживаться в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* при температуре 37 °C [2]. Выявленное свойство представляет определенный теоретический и практический интерес: во-первых, в плане сопоставления особенностей репликативных функций плазмиды pM3 с таковыми известных природных термочувствительных плазмид, например, плазмиды Rts1 бактерий *Proteus vulgaris* [3] и pPS10 бактерий *Pseudomonas savastanoi* [4]; во-вторых, имеет прикладное значение - позволяет использовать плазмиду pM3 в генетическом анализе бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в частности, для создания на ее основе векторов для транспозонного мутагенеза и хромосоммобилизующих факторов [5].

Целью настоящей работы явилось получение и характеристика терморезистентного варианта плазмиды pMT2 группы IncP-9.

Материал и методика

В работе использовались штаммы и плазмиды, характеристика которых представлена в табл.1.

Характеристика штаммов и плазмид, использованных в работе

Штамм	Характеристика	Источник
<i>E. coli</i> DH5 α	(F ϕ 80, <i>dlacZ</i> , Δ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hscR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoRD</i> (<i>lacZYA-argF</i>) U169	[6]
<i>E. coli</i> C600	<i>thr1</i> , <i>thi-1</i> , <i>leuB6</i>	Коллекция кафедры генетики
<i>Erw. chrysanthemi</i> NA49	Прототроф	То же
<i>S. typhimurium</i> 487	Прототроф	--/--
<i>C. freundii</i> 467	Прототроф	--/--
<i>K. aerogenes</i> 62-1	<i>trpD</i> , <i>pheA</i> , <i>tyrA</i>	--/--
<i>S. marcescens</i> B140	Прототроф	--/--
<i>E. coli</i> TG1	Δ (<i>lac-pro</i>), <i>thi-1</i> , <i>hscR</i> , <i>supE</i>	--/--
<i>P. aeruginosa</i> ML4600	<i>trp3</i> , <i>his7</i>	--/--
<i>P. putida</i> KT2442	Прототроф, Rif ^R	[7]
Плазмида		
pM3	Tra ⁺ , Tc ^R , Sm ^R	[8]
pMT2	Km ^R , мини-репликон плазмиды pM3	[9]
RP4Km ^S	Am ^R , Tc ^R , Tra ⁺ , IncP	--/--
pMT2R	Km ^R , термореистентный вариант pMT2	Получен в данной работе
pUC18	Am ^R , ColE1 репликон	[10]
pUC-pMT2	В Sall-сайт плазмиды pUC18 встроена плазмида pMT2, предварительно линеализированная рестриктазой XhoI	Получен в данной работе
pUC-pMT2R	В Sall-сайт плазмиды pUC18 встроена плазмида pMT2R, предварительно линеализированная рестриктазой XhoI	То же
pMT2-1	В плазмиду pMT2 встроен фрагмент NotI-AflIII плазмиды pMT2R, содержащий <i>orf1</i> , <i>rep</i> и <i>oriV</i>	--/--
pMT2R-1	В плазмиду pMT2R встроен фрагмент NotI-AflIII плазмиды pMT2, содержащий <i>orf1</i> , <i>rep</i> и <i>oriV</i>	--/--
pGEM-T	Am ^R , ColE1 репликон	Promega (США)
pOLE1	Sm ^R , IncQ-репликон, <i>tac</i> -промотор	[11]
pRWX	Tc ^R , IncP-репликон, <i>lacZ</i> и <i>ху/Е</i> -ген без промотора	[12]
pOLEMT2	Sm ^R , продукт амплификации <i>rep</i> -гена pMT2 встроен за <i>tac</i> -промотором в плазмиду pOLE1 между EcoRI- и Sall-сайтами	Получен в данной работе
pRWMT	Tc ^R , промотор <i>rep</i> -гена плазмиды pMT2 встроен перед геном <i>ху/Е</i> в плазмиду pRWX между BamHI- и EcoRI-сайтами	То же
pRWMT ^R	Tc ^R , промотор <i>rep</i> -гена плазмиды pMT2R встроен перед геном <i>ху/Е</i> в плазмиду pRWX между BamHI- и EcoRI-сайтами	--/--

Бактерии выращивали в LB-бульоне и на LB-агаре [13]. Применялись коммерческие препараты антибиотиков ампициллина (Ap) в концентрации 100 мкг/мл, тетрациклин гидрохлорида (Tc), стрептомицин сульфата (Sm), канамицина (Km) в концентрации 25 мкг/мл. IPTG и X-Gal производства «MBI Fermentas» (Вильнюс) готовили согласно рекомендациям фирмы-изготовителя и использовали в концентрациях 0,5 мМ и 50 мкг/мл соответственно.

Манипуляции с плазмидами. Плазмидную ДНК выделяли с использованием Kit Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, США).

Фрагменты рестрикции и продукты амплификации вырезали из агарозного геля и очищали с помощью Kit GeneClean Spin (Bio101, США).

Трансформацию бактерий *E. coli* плазмидной ДНК проводили согласно методическим рекомендациям, изложенным в [14].

Рестрикцию, обработку фрагментом Кленова и последующее лигирование фрагментов плазмидной ДНК проводили в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей Boehringer Mannheim (Германия) и Biolabs (Англия), Fermentas (Литва). В качестве реперной ДНК при определении размеров рестрикционных фрагментов использовали 1 kb репер (Biolabs, Англия).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась с праймерами *ЬoriV2* (5'-CGG GAT CCC GCT AGC TCA TAT GTG A-3') и *еoriV2* (5'-GGA ATT CCG TGC TTG GTC AGG ATG-3'), содержащими на 5'-концах соответственно BamHI- и EcoRI-сайты и позволяющими амплифицировать промоторную область *rep*-гена плазмиды pMT2 (или pMT2R) при режиме амплификации: 94 °C - 5 мин (1 цикл);

94 °C – 30 с, 61 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (25 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл). Полученные продукты ПЦР размером 410 п. н. клонировали в вектор pGEM-T, секвенировали, вырезали с помощью ферментов BamHI – EcoRI и встраивали в плазмиду pRWX непосредственно перед геном *хуЕ*, не содержащим промотора. *rep*-Ген плазмиды pMT2 амплифицировали с использованием праймеров Forward (5'-GGA AAT CAT GGC CAA TGA CAA AAA CGA G-3') и Reverse (5'-GTC GAC TCA GTT ACC GTG GGG AAT A-3'), содержащих на 5'-концах EcoRI- и Sall-сайты рестрикции соответственно. Режим амплификации *rep*-гена: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (2 цикла); 94 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (25 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл). Продукт амплификации размером 554 п. н. клонировали в вектор pGEM-T, секвенировали, вырезали с помощью ферментов EcoRI, Sall и встраивали в плазмиду pOIEI непосредственно за *lac*-промотором между сайтами EcoRI, Sall.

Сиквенса-анализ проводили с использованием стандартных праймеров M13/pUC(-40) 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3' и M13/pUC(-48) 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3' для определения нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации, встроенных в состав вектора pGEM-T. Для поиска мутации в плазмиде pMT2R был взят ряд праймеров, позволяющих определить ее полную нуклеотидную последовательность в сравнении с таковой плазмиды pMT2: *parF* (5'-TCG TAA TAC GCA GGG TTC-3'), *parR* (5'-TGG ACG ATA TGG ATC TGG-3'), *1Fa* (5'-GAG CCA AGT GCG CCA GGT TTG-3'), *1Ra* (5'-GCG TTT CAT GGT GAC CTT CC-3'), *1Fb* (5'-TGG CTG ATG CCT GGT AAG GG-3'), *1Rb* (5'-TCG CCG TGT TCC TCG CGA AG-3'), *2Fa* (5'-GGA AAT GAA ACG GGC CTG C-3'), *2Ra* (5'-GTC ATG GGT CAA CGT CCT TGG-3'), *3Fa* (5'-GCA GAC CCA TTC CAT GAC CAC C-3'), *3Ra* (5'-CTC TGC CGC TCC CGC CG-3'), *3Fc* (5'-GAT GAT CGA CAT GAT GGC GG-3'), *3Rc* (5'-CCA CCG ACA CTG ATG GTC TG-3'), *F1* (5'-GGT TCG GTG GGG TGT C-3'), *R1* (5'-CAT CAC ATT CGG CGA CG-3'), *Fori* (5'-GCT CAG TCT GTA CCC ATG TAC CG-3'), *Rori* (5'-GTA TCC GTG ATG AGC TGT CAG TCG-3'), *orfI-F1* (5'-GAC AAA CCA TCC ACG AAG-3'), *orfI-F2* 5'-CGG TGA ATT CTT CCT TGC-3'), *orfI-R1* (5'-GAG GAT CAG GCT GAT TTG-3'), *tolA-R* (5'-GAA AGA CTG GGA ATG ACG-3'), *tolA-F* (5'-ATT GGT CAT ATC CGC CTG-3'). При этом в качестве матрицы использовали плазмиды pUC-pMT2 и pUC-pMT2R. Реакцию сиквенса проводили с реактивами BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems) и сиквентором ABI373 или 377. Результаты сиквенса обрабатывали с помощью компьютерной программы [15]. Секвенированные последовательности сравнивали с использованием программы GAP (GCG).

Активность катехол-2,3-оксигеназы (продукт гена *хуЕ*) определяли согласно методике, приведенной в работе [16]. Бактерии выращивали в отсутствие и при добавлении 0,1 мМ IPTG.

Определение стабильности наследования плазмид. Плазмидсодержащие бактерии (10^4 кл/мл) вносили в жидкую полноценную среду и выращивали при температуре 28 и 37 °C до стационарной фазы роста, после чего производили высев на агаризованную среду. У клеток, сформировавших колонии, выявляли сохранность плазмидных маркеров. Стабильность наследования определяли как соотношение количества клонов, растущих на канамицине, к общему количеству проверенных клонов.

Результаты и их обсуждение

Как указывалось ранее, плазмида pM3 обладает свойством температурной нестабильности, что выражается в ее 100 % элиминации при выращивании плазмидсодержащих бактерий при температуре 37 °C в течение 20 генераций в неселективных условиях. Установлено, что данное свойство проявляется только в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* [2].

Для дальнейшего анализа представлялось важным выяснить, каким образом наследуется сконструированный мини-репликон плазмиды pM3 (плазмиды pMT2) [9]. Существенным преимуществом использования минимизированного варианта плазмиды pM3 является наличие его полной нуклеотидной последователь-

ности [17], что позволяет осуществлять различного рода генетические манипуляции с целью изучения механизма репликации и поддержания данного репликона в бактериальной клетке. Анализ наследования рMT2 в сравнении с таковым плазмиды рM3 позволил установить, что стабильность его поддержания в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* не отличается от исходного репликона (табл. 2). Следовательно, генетические детерминанты, обуславливающие свойство термонестабильности, локализованы в пределах клонированной последовательности.

Таблица 2

Наследование плазмиды рM3 и мини-репликона рMT2 в бактериях семейства *Enterobacteriaceae*

Бактерия-хозяин	Частота восприятия плазмиды рM3	Сохранность плазмиды рM3 (в %) при		Частота восприятия плазмиды рMT2	Сохранность плазмиды рMT2 (в %) при	
		28 °С	37 °С		28 °С	37 °С
<i>E. COIIC</i> 600	1,8-10 ⁴ ₃	68	0	3,1-10 ¹⁰ ^о	64	0
<i>Erw. chrysanthemi</i> 40-40	1,6-10 ⁻⁶	99	0	4,1-10 ¹⁰ ^о	80	0
<i>S. typhimurium</i> 487	1,6-10 ¹¹ ^о	25	0	2,1-10 ¹⁰ ^о	50	0
<i>C. freundii</i> 467	8,5-10 ¹⁰ ^о	47	0	5,7-10 ¹⁰ ^о	20	0
<i>K. aerogenes</i> 62-1	1,7-10 ¹⁴ ^о	99	0	2,3-10 ¹⁰ ^о	86	0
<i>S. marcescens</i> B140	5,6-10 ¹¹ ^о	99	0	3,2-10 ¹⁰ ^о	90	0

Примечание. В качестве доноров плазмиды рMT2 служили бактерии *E. COI/*ТG1/ RP4 Km

Свойство температурной нестабильности у изученных в этом отношении внехромосомных элементов проявляется в клетках гетерологичных хозяев и связано с функцией генетических систем, локализованных в пределах плазмидного генома и определяющих процессы репликации и сегрегации [4, 18, 19]. Исходя из этого, было выдвинуто предположение, что подобного рода детерминанты должны входить в состав репликона рMT2 и полученные варианты данной плазмиды с измененной стабильностью наследования позволят определить генетические локусы, ответственные за функцию термочувствительности.

Для получения мутантов плазмиды рMT2 был предпринят подход, заключающийся в отборе спонтанных терморезистентных вариантов, способных под-держиваться в бактериях *E. coli* при непермиссивной температуре культивиро-вания. Селекцию таких вариантов осуществляли путем культивирования плазм-идсодержащих бактерий в присутствии селективного давления (в LB-бульон добавлялся канамицин в концентрации 25 мкг/мл) при температуре 37 °С.

В результате экспериментов был отобран вариант плазмиды рMT2 (рMT2R), характеризующийся достоверно более высокой стабильностью наследования при температуре 37 °С. При непермиссивных условиях культивирования после 20 генераций плазида рMT2R сохранялась в клеточной популяции с частотой 5 % (табл. 3).

Для картирования спонтанной мута-ции была определена полная нуклео-тидная последовательность плазмиды рMT2R в сравнении с таковой рMT2. В качестве матрицы для секвенирующей реакции использовали гибридные мо-лекулы, полученные путем лигирования мутантной (рMT2R) и исходной (рMT2) плазмид с вектором рUC18, предвари-

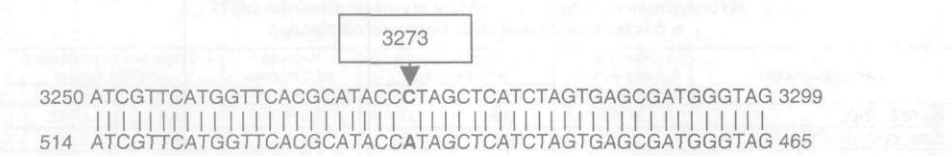
тельно линеализированных с помощью XhoI и Sail соответственно. Сиквенс-анализом была зарегистрирована одна точечная мутация в положении -10 про-моторной области гер-гена, возникшая в результате трансверсии, приведшей к замене цитозина на аденин в положении 3273 (рисунок). Поскольку выявленное изменение промотора должно сказываться на эффективности транскрипции гер-гена, были изучены активности мутантного и исходного промоторов. Для этого посредством амплификации промоторной области исходной и мутантной плазмид были получены фрагменты ДНК размером 450 п. н., содержащие на концах сайты для рестриктаз BamHI и EcoRI соответственно, которые клониро-вали в составе вектора рGEM-T. Сиквенс клонированных последовательностей

Таблица 3

Наследование рMT2-вариантов в бактериях *E. coli* DH5α

Плазида	Стабильность наследования плазмиды (в %) при температуре	
	28 °С	37 °С
рMT2	96	0
рMT2R	97	5
рMT2-1	100	0
рMT2R-1	100	0,03

подтвердил наличие в амплифицированном фрагменте плазмиды рMT2R указанной замены нуклеотидов в положении 3273. Клонированные продукты амплификации вырезались из плазмиды рGEM-T с помощью рестриктаз BamHI и EcoRI и встраивались между BamHI- и EcoRI-сайтами непосредственно перед геном *хуЕ* в вектор широкого круга хозяев рRWX (группа IncP-1). Полученные конструкции, обозначенные как рRWMTR (содержит мутантный промотор) и рRWMT (содержит исходный промотор), вводились в клетки *E. coli*, *P. putida* и *P. aeruginosa*, у которых при различных температурах культивирования определялась активность катехол-2,3-оксигеназы, детерминируемая *хуЕ*-геном.



Картирование мутации в пределах репликаона рMT2R.

Сверху указана последовательность ДНК промоторной области плазмиды рMT2, а снизу - аналогичная последовательность плазмиды рMT2R, определенные в результате сикенс-анализа плазмид рUC-рMT2 и рUC-рMT2R соответственно

Активность промоторов устанавливалась в отсутствие и присутствии Рер-белка плазмиды рMT2, для чего использовалась конструкция рOLEMT2, в которой гер-ген был клонирован непосредственно за *tac*-промотором (амплифицированный гер-ген клонировали между EcoRI- и SalI-сайтами в плазмиду рOLEI группы IncP-4 несовместимости). Как видно из данных, приведенных в табл. 4, мутантный промотор характеризовался пятикратным увеличением активности, при этом активность обоих промоторов в клетках *E. coli* достоверно повышалась при температуре 37 °C и эффективно репрессировалась в присутствии в клетках Рер-белка.

Таблица 4
Активность исходного и мутантного промоторов *гер*-гена в отсутствие и присутствии Рер-белка плазмиды рMT2

Плазмида, присутствующая в клетке	Активность катехол-2,3-оксигеназы, у. е.					
	<i>E. coli</i> DH5α		<i>P. putida</i> KT2442		<i>P. aeruginosa</i> ML4600	
	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C
рRWMT	0,06	0,21	0,72	0,78	1,07	1,60
рRWMT и рOLEMT2	0,01	0,004	0,28	0,27	0,21	0,62
рRWMT и рOLEMT2 0,1 mM IPTG	0	0	0,028	0,018	0	0,000322
рRWMTR	0,23	1,04	1,44	1,45	0,74	4,62
рRWMTR и рOLEMT2	0,07	0,034	0,52	0,42	0,28	1,01
рRWMTR и рOLEMT2 0,1 mM IPTG	0	0,01	0,053	0,021	0,0069	0,0018

Примечание. В присутствии IPTG повышается экспрессия Рер-белка.

Полученные результаты позволяют предполагать, что стабилизация наследования плазмиды рMT2R связана с транскрипционной активностью гер-промотора и не зависит от изменений его регуляции Рер-белком, что можно было бы ожидать в случае отсутствия (достоверного снижения) репрессии мутантного промотора в присутствии гер-гена.

Влияние выявленного мутационного изменения в промоторном участке *гер*-гена было дополнительно подтверждено посредством перекрестной замены данной области (фрагмента NotI-AflII) в геноме исходной и мутантной плазмид. При включении в мутантную плазмиду промоторного участка исходной плазмиды полученный гибридный репликон характеризовался температурной нестабильностью, и, наоборот, введение измененной последовательности в исходную плазмиду обеспечивало ее стабилизацию при культивировании плазмидосодержащих бактерий при 37 °C (см. табл. 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований можно заключить, что свойство термонестабильности плазмиды рMT2 IncP-9 в бактериях *E. coli* связано с репликативной системой и зависит от эффективности экспрессии Рер-белка, обеспечивающего процесс инициации репликации. Следует отме-

тить, что в этом отношении плазмида рMT2 имеет некоторое сходство с плазмидой рPS10, стабилизация которой в клетках гетерологичных хозяев также связана с системой инициации репликации и обусловлена мутациями в LZ-последовательность Rep-белка, приводящими к снижению репрессии промотора гер-гена и тем самым обеспечивающими увеличение концентрации белка инициации в бактериальной клетке [4].

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (тема 974).

1. Benson S., Shapiro J. // J. Bacteriol. 1978. Vol. 135. P. 278.
2. Титок М.А., Максимова Н.П., Фомичев Ю. К. // Молекул, генетика, микробиология и вирусология. 1991. № 9. С. 9.
3. Murata T., Ohnishi M., Ara T. et al. // J. Bacteriol. 2002. Vol. 184. P. 3194.
4. Fernandez-Tresguerres M.E., Martin M., Garcia de Viedma D. et al. // J. Bacteriol. 1995. Vol. 177. P. 4377.
5. Титок М.А. // Генетика. 2003. Т. 39. С. 1606.
6. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J. et al. // Nucl. Acids Res. 1989. Vol. 17. P. 3469.
7. Franklin F.C., Bagdasarian M., Bagdasarian M. M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1981. Vol. 78. P. 7458.
8. Желдакова Р.А., Максимова Н.П., Кульба А. М. и др. // Молекул, генетика, микробиология и вирусология. 1985. № 1. С. 26.
9. Титок М.А., Олехнович И.Н., Евтушенков А. Н. // Там же. 1991. № 3. С. 18.
10. Yanisch-Perron C., Vierira J., Messing J. // Gene. 1985. Vol. 33. P. 103.
11. Jagura-Burdzy G., Kostelidou K., Pole J. et al. // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 2807.
12. El-Robb M.S., Busby S.J. W. // Biochem. J. 2002. Vol. 368. P. 835.
13. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, 1989.
15. Devereux J., Haeblerli P., Smithies O. // Nucl. Acids Res. 1984. Vol. 12. P. 387.
16. Zukowski M.M., Gaffney D.F., Speck D. et al. // Proc Natl Acad Sci. 1983. Vol. 80. P. 1101.
17. Greated A., Titok M.A., Krasowiak R. et al. // Microbiol. 2000. Vol. 146. P. 2249.
18. Tian Q.B., Ohnishi M., Tabuchi A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. Vol. 220. P. 280.
19. Okawa N., Tsuchiya H., Mori K. et al. // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 2600.

Поступила в редакцию 10.12.2004.

Марина Алексеевна Титок - кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.

УДК 579.8.841.11:252.5

М.А. ТИТОК

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ ПЛАЗМИДЫ рMT2 (IncP-9)

We have determined the location of determinants responsible for incompatibility function of the рMT2 plasmid of the P-9 incompatibility group. It appears that incompatibility is due to the *rep* gene and the promoter region of the *par* operon. These results provide the basis for directed selection of multicopy variants of the рMT2 plasmid that could be used for the construction of broad host range vectors for molecular cloning.

Внехромосомные генетические элементы, имеющие сходные (или идентичные) системы инициации репликации (гер-области), а также локусы, ответственные за распределение плазмидных копий в процессе деления клетки (пар-области), не способны вместе наследоваться одной бактериальной клеткой [1, 2]. Данное свойство - главный критерий классификации плазмид. Основной таксономической единицей является группа несовместимости, объединяющая сходные плазмидные репликоны [3].

Плазмиды рMT2, являясь мини-репликоном, обладает основными свойствами, присущими исходной плазмиде рM3 группы несовместимости P-9. В частности, она способна поддерживать в клетках различных грамотрицательных микроорганизмов, характеризуется нестабильностью наследования при температуре 37 °C в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* и несовместима с исходным репликоном рM3 [4]. Наличие полного сиквенса плазмиды рMT2 [5] создает необходимые предпосылки для детального изучения систем репликации и